



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/10</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/15645</p> <p>(43) 国際公開日 1999年4月1日(01.04.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04201</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月18日(18.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/256795 1997年9月22日(22.09.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 林崎良英(HAYASHIZAKI, Yoshihide)[JP/JP] 〒305-0074 茨城県つくば市高野台三丁目1-1 理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) カルニンチ ピエロ(CARNINCI, Piero)[IT/JP] 〒305-0074 茨城県つくば市高野台三丁目1-1 理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 塩澤寿夫, 外(SHIOZAWA, Hisao et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: METHOD FOR ISOLATING DNA</p> <p>(54)発明の名称 DNAの単離方法</p> <p>(57) Abstract A method for isolating DNA comprising: (A) feeding into a column provided with a DNA-binding carrier on a membrane filter a solution which contains a biological sample containing a salt, a cationic surfactant and a DNA and in which the concentration of the salt is not lower than the precipitation inhibition starting concentration and thus making the DNA contained in the biological sample to bind to the DNA-binding carrier; (B) sucking off the solution from the column and separating the carrier having the DNA bound thereto from other components; (C) feeding a DNA-dissociating solution into the column to thereby dissociate the DNA from the carrier; and (D) sucking off the dissociation solution from the column and taking up the solution containing the dissociated DNA. According to this method, a purified DNA can be taken up in a high yield without resort to any pretreatment of a biological sample.</p>		

(57)要約

(A) メンブレンフィルター上に DNA 結合性担体を設けたカラムに、塩、カチオン界面活性剤及び DNA を含む生体試料を含み、かつ前記塩の濃度が沈殿阻害開始濃度以上である溶解溶液を供給して、前記生体試料中に含まれていた DNA を DNA 結合性担体に結合させ、(B) 溶解溶液を吸引によりカラムから除去して DNA を結合した担体を他の成分から分離し、(C) カラムに DNA 解離溶液を供給して、担体から DNA を解離させ、及び (D) 解離溶液を吸引によりカラムから分離して解離した DNA を含む溶液を回収する、DNA 単離方法を開示する。この方法によれば、生体試料を前処理することなく、かつ精製された DNA を高い収率で回収することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダッド・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	

明細書

DNAの単離方法

技術分野

本発明は、血液、細胞及び生体組織等の生体試料中に含まれるDNAを単離する方法に関する。

背景技術

遺伝子工学の分野において、大腸菌等の微生物を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、増殖した形質転換体から所望のプラスミドDNAを回収することが常時行われている。また、癌や遺伝病等についてのDNA情報を入手して診断に用いる等の目的で、血液、細胞及び生体組織等の生体試料中に含まれるDNAを回収することも行われている。

形質転換体からプラスミドDNAをより簡単に回収精製する方法としては、例えば、特開平4-360686号公報、特開平8-23976号公報、R. Room et al., J. Clin. MicroBiol. Vol.28, No.3, p495-503、特開平7-250681号公報に記載の方法がある。

中でも、前記 R. Room et al., J. Clin. MicroBiol. Vol.28, No.3, p495-503 に記載されたカオトロピックイオン法は、DNA吸着性の担体とカオトロピックな溶液とを併用して、微生物中に含まれるRNAとDNAとを分離して、DNAのみを単離できる優れた方法である。前記特開平7-250681号公報は、この方法を利用し、2種類のカートリッジを用いて微生物菌体からDNAのみを精製する方法を開示する。

ところが、上記カオトロピックイオン法を用いた場合、微生物が対象であ

る場合とは異なり、血液、細胞及び生体組織等の生体試料が対象である場合、これら生体試料中に含まれるDNAを生体試料を前処理等することなしに単離することができなかつた。例えば、血液に含まれるDNAを単離する場合、上記カオトロピックイオン法ではタンパク質も担体に捕捉されてしまうため、DNAを単離回収できない。

そこで、上記生体試料からDNAを単離するためのカオトロピックイオン法以外の方法として、カチオン界面活性剤を用いる方法が知られている。

例えば、0.5～0.6Mの塩化ナトリウムとカチオン界面活性剤としてアルキルベンジルジメチルアンモニウム塩の存在下で血液に含まれるDNAを沈殿させる方法[米国特許 5,010,183号]が知られている。

しかし、上記の方法は、血液を前処理(分離)等することなしにそのまま試料として使用してDNAを回収することができず、例えば血液から白血球を分離する等の前処理を必要とする。また、DNAの収率や純度も決して高いものではなかつた。

そこで本発明の目的は、生体試料を前処理することなくそのまま使用することができ、かつDNAの収率も高い精製されたDNAを回収する方法を提供することにある。

さらに本発明の目的は、生体試料を前処理することなくそのまま使用することができ、かつDNAの収率も高い精製されたDNAを回収する方法であって、オートメーション化が可能なように、遠心分離や抽出等の煩雑な操作も不要であり、より簡単な構造の器具を使用し、かつより少ない操作により行える方法を提供することにある。

発明の要旨

本発明は、(a) DNA を含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有し、かつ前記塩の濃度が DNA の沈殿を阻害し始める濃度（以下、沈殿阻害開始濃度という）以上である溶解溶液を、DNA 結合性担体と接触させて、前記試料中の DNA を前記 DNA 結合性担体に結合させる工程、

(b) DNA を結合した担体を他の成分から分離する工程、

(c) 分離した担体から結合した DNA を解離させる工程、及び

(d) 解離した DNA を回収する工程

を含む、生体試料中に含まれる DNA を単離する方法(第 1 の方法)に関する。

さらに本発明は、(A) 溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上に DNA 結合性担体を設けたカラムに、塩、カチオン界面活性剤及び DNA を含む生体試料を含み、かつ前記塩の濃度が沈殿阻害開始濃度以上である溶液を供給して、前記生体試料中に含まれていた DNA を DNA 結合性担体に結合させる工程、

(B) 溶解溶液を吸引によりカラムから除去して DNA を結合した担体を他の成分から分離する工程、

(C) カラムに DNA 解離溶液を供給して、担体から DNA を解離させる工程、及び

(D) 解離溶液を吸引によりカラムから分離して解離した DNA を含む溶液を回収する工程

を含む、生体試料中に含まれる DNA を単離する方法(第 2 の方法)に関する。

図面の簡単な説明

図 1 は、参考例で得られた塩濃度と 260nm の吸光度との関係を示す図である。

図 2 は、実施例 2 で得られた電気泳動の結果を示す。

発明を実施するための好ましい態様

DNA 単離方法(第 1 の方法)

工程 (a) では、DNA を含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有し、かつ前記塩の濃度が DNA の沈殿阻害開始濃度以上である溶解溶液を、DNA 結合性担体と接触させて、前記試料中の DNA を前記 DNA 結合性担体に結合させる。DNA 結合性担体と接触のインキュベーション時間は、溶解溶液の組成及び量、並びに DNA 結合性担体の種類と量により適宜決定できるが、通常、3～5分程度で十分である。また、インキュベーションは非加温で行うことができ、必要により、適宜加熱することもできるが、含まれる DNA が変性する条件は避けることが好ましい。

DNA を含む生体試料は、例えば、血液、細胞又は生体組織であることができる。細胞は、真核生物細胞又は細菌細胞であることができる。血液は扱いが難しい生体試料であり、従来の方法では DNA の単離が困難であったが、本発明の方法によれば、DNA を単離することができる。溶解溶液中の DNA を含む生体試料の濃度は、生体試料の種類、溶解溶液の組成、及び DNA 結合性担体の種類に応じて適宜決定できる。

カチオン界面活性剤としては、例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、及びセチルピリジニウムブロミドからなる群から選ばれる 1 種または 2 種以上の界面活性剤を挙げるができる。

しかし、これらの界面活性剤に限定されるものではない。また、カチオン界面活性剤の濃度は、臨界ミセル濃度を考慮して決定され、通常 0.01～10%の範囲である。

塩は、無機酸塩(例えば、塩化物、硝酸塩、硫酸塩、燐酸塩等)または有機酸塩(例えば、酢酸塩、クエン酸塩等)であることができる。より具体的には、NaCl やその他の塩 (例えば、Cl、Br、酢酸、蟻酸と組み合わせた場合の Na、K、Li による全ての塩) を挙げるることができる。

工程(a)では、DNA を含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有する溶液の塩濃度を DNA の沈殿阻害開始濃度以上とする。これにより、溶液中に含まれる DNA を選択的に、DNA 結合性担体に結合させることができる。沈殿阻害開始濃度は、溶液中に含まれる塩の種類により異なり、また、同一の塩であっても、その他の含有成分の種類と濃度によっても変化し、各塩について、適宜決定することができる。例えば、塩化ナトリウムの場合、後述するように、沈殿阻害開始濃度は約 0.6M である。

また、塩濃度は、沈殿阻害開始濃度の 2 倍の塩濃度または DNA の全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下であることが、溶液中に含まれる DNA の DNA 結合性担体への結合効率を考慮すると好ましい。DNA の全量が溶解する塩濃度も、沈殿阻害開始濃度と同様に、溶液中に含まれる塩の種類により異なり、また、同一の塩であっても、その他の含有成分の種類と濃度によっても変化し、各塩について、適宜決定することができる。例えば、塩化ナトリウムの場合、後述するように、DNA の全量が溶解する塩濃度は約 0.8M である。

生体試料が少なくとも 2 本鎖直鎖 DNA 及び 1 本鎖直鎖 DNA を含有する場合、工程 (a) において、2 本鎖直鎖 DNA を DNA 結合性担体を選

択的に結合させて、生体試料中に含まれる 2 本鎖直鎖 DNA を選択的に単離することもできる。この場合、溶解溶液としてさらに水素結合切断剤を含む溶液を用いることが好ましい。水素結合切断剤としては、例えば、尿素及びホルムアルデヒドを挙げることができる。尿素有濃度は、例えば、10% (w/v) 以上であることができる。

DNA 結合性担体としては、ガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ヒドロキシアパタイト及びセライトからなる群から選ばれる材料からなる、メッシュフィルター、ビーズまたは粉末を挙げることができる。

工程 (b) においては、DNA を結合した担体を濾過または遠心分離し、得られる担体を沈殿阻害開始濃度以上の塩濃度を有する洗浄溶液で洗浄することにより、DNA を結合した担体を他の成分から分離する。洗浄溶液が、好ましくは、沈殿阻害開始濃度の 2 倍の塩濃度または DNA の全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下の塩濃度を有する。また、担体の洗浄は、カチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液及び揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液で順次行うことが好ましい。カチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液を用いることで、担体から不純物を除去し、ついで揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液を用いることで、担体からカチオン界面活性剤を除去することができる。尚、上記揮発性有機溶媒は、担体に結合した DNA を変性させることがなく、かつ洗浄後速やかに揮発するという観点からエタノールであることが好ましい。

洗浄後、必要により、担体を乾燥することができるが、過度の乾燥は、担体に結合した DNA の解離を妨げる場合がある。

上記洗浄溶液及び／又は溶解溶液は、DNA 結合性担体同士が吸着して

取り扱いが困難になることを回避するという観点からグリセロールを含有する溶液であることが好ましい。グリセロールの添加量は、例えば、1～50%の範囲とすることができる。

工程(c)において、分離した担体を、DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液と混合することにより、結合したDNAを担体から解離させる。DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液は、例えば、水又は加熱水であることができ、加熱水の温度は、DNAが溶解しやすい温度を適宜選択できる。

工程(d)において、解離したDNAを含む溶液と担体との混合物を固液分離することにより、解離したDNAを溶液として回収する。固液分離は、例えば、遠心分離や濾過であることができる。

DNA単離方法(第2の方法)

工程(A)では、溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上にDNA結合性担体を設けたカラムに、塩、カチオン界面活性剤及びDNAを含む生体試料を含み、かつ前記塩の濃度が沈殿阻害開始濃度以上である溶液を供給して、前記生体試料中に含まれていたDNAをDNA結合性担体に結合させる。

本発明の第2の方法は、DNA結合性担体を溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上に設けたカラムを用いること以外は、実質的に、第1の方法と共通する部分が多い。

上記カラムは、単独のパイプ(管)の一方の開口にメンブレンフィルターを設けたものであっても、あるいは、一定の厚みを有する基板に複数の貫通孔が設けられ、それら貫通孔の一方の開口にメンブレンフィルターを設けた物であってもよい。後者の場合、複数のDNAを含む試料からのDNAの単離を、基板に設けら

れた複数のカラムで並行して行うことができ、多種類のサンプルの処理を迅速に行うことができるという利点がある。

DNA 結合性担体としては、ガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト及びセライトからなる群から選ばれる材料からなる、メッシュフィルター、ビーズまたは粉末を挙げることができる。

また、メンブレンフィルターは、溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するものである。即ち、非吸引時には、メンブレンフィルター上に溶液が保持され、溶液を保持する側とは反対側から吸引することで、保持された溶液がメンブレンフィルターを介して排出される性能を有するものである。このようなメンブレンフィルターを用いることで、DNA 結合性担体と DNA を含む溶液とのインキュベーション時間、溶液の排出、さらには洗浄等を制御しながら行うことができるという利点がある。特に、固液分離に遠心分離を必要としないので、方法を自動化しやすいという利点もある。

DNA 結合性担体と接触のインキュベーション時間は、溶解溶液の組成及び量、並びに DNA 結合性担体の種類と量により適宜決定できるが、通常、3～5分程度で十分である。また、インキュベーションは非加温で行うことができ、必要により、適宜加熱することもできるが、含まれる DNA が変性する条件は避けることが好ましい。

DNA を含む生体試料は、例えば、血液、細胞又は生体組織であることができる。細胞は、真核生物細胞又は細菌細胞であることができる。血液は扱いが難しい生体試料であり、従来の方法では DNA の単離が困難であったが、本発明の方法によれば、DNA を単離することができる。溶解溶液中の DNA を含む生体試料の濃度は、生体試料の種類、溶解溶液の組成、及び DNA 結合性担体の種類に応じて適宜決定できる。

カチオン界面活性剤としては、例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、及びセチルピリジニウムブロミドからなる群から選ばれる1種または2種以上の界面活性剤を挙げることができる。しかし、これらの界面活性剤に限定されるものではない。また、カチオン界面活性剤の濃度は、臨界ミセル濃度を考慮して決定され、通常0.01～10%の範囲である。

塩は、無機酸塩(例えば、塩化物、硝酸塩、硫酸塩、燐酸塩等)または有機酸塩(例えば、酢酸塩、クエン酸塩等)であることができる。

工程(A)では、DNAを含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有する溶液の塩濃度をDNAの沈殿阻害開始濃度以上とする。これにより、溶液中に含まれるDNAを選択的に、DNA結合性担体に結合させることができる。沈殿阻害開始濃度は、溶液中に含まれる塩の種類により異なり、また、同一の塩であっても、その他の含有成分の種類と濃度によっても変化し、各塩について、適宜決定することができる。例えば、塩化ナトリウムの場合、後述するように、沈殿阻害開始濃度は約0.6Mである。

また、塩濃度は、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下であることが、溶液中に含まれるDNAのDNA結合性担体への結合効率を考慮すると好ましい。DNAの全量が溶解する塩濃度も、沈殿阻害開始濃度と同様に、溶液中に含まれる塩の種類により異なり、また、同一の塩であっても、その他の含有成分の種類と濃度によっても変化し、各塩について、適宜決定することができる。例えば、塩化ナトリウムの場合、後述するように、DNAの全量が溶解する塩濃度は約0.8Mである。

生体試料が少なくとも2本鎖直鎖 DNA 及び1本鎖直鎖 DNA を含有する場合、工程（A）において、2本鎖直鎖 DNA を DNA 結合性担体を選択的に結合させて、生体試料中に含まれる2本鎖直鎖 DNA を選択的に単離することもできる。この場合、溶解溶液としてさらに水素結合切断剤を含む溶液を用いることが好ましい。水素結合切断剤としては、例えば、尿素及びホルムアルデヒドを挙げることができる。尿素の濃度は、例えば、10% (w/v)以上であることができる。

工程（B）で、溶解溶液をして DNA を結合した担体を他の成分から分離する。特に、DNA を結合した担体をメンブレンフィルターを介して、吸引濾過によりカラムから除去し、得られる担体を沈殿阻害開始濃度以上の塩濃度を有する洗浄溶液で洗浄することにより、DNA を結合した担体を他の成分から分離する。洗浄溶液が、好ましくは、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度または DNA の全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下の塩濃度を有する。また、担体の洗浄は、カチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液及び揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液で順次行うことが好ましい。カチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液を用いることで、担体から不純物を除去し、ついで揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液を用いることで、担体からカチオン界面活性剤を除去することができる。尚、上記揮発性有機溶媒は、担体に結合した DNA を変性させることがなく、かつ洗浄後速やかに揮発するという観点からエタノールであることが好ましい。

洗浄後、必要により、担体を乾燥することができるが、過度の乾燥は、担体に結合した DNA の解離を妨げる場合がある。

上記洗浄溶液及び／又は溶解溶液は、DNA 結合性担体同士が吸着して

取り扱いが困難になることを回避するという観点からグリセロールを含有する溶液であることが好ましい。グリセロールの添加量は、例えば、1～50%の範囲とすることができる。

工程（C）においては、カラムにDNA解離溶液を供給して、担体からDNAを解離させる。分離した担体を、DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液と混合することにより、結合したDNAを担体から解離させることができる。DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液は、例えば、水又は加熱水であることができ、加熱水の温度は、DNAが溶解しやすい温度を適宜選択できる。

工程（D）においては、解離溶液を吸引によりカラムから分離して解離したDNAを含む溶液を回収する。

本発明の第2の方法は、溶液と担体との分離を吸引濾過によりおこなうことができるため、自動化し易いという利点がある。

実施例

以下本発明を実施例によりさらに説明する。

参考例（沈殿阻害開始濃度の測定）

溶液組成

0～1.5M NaCl

30mM Tris (pH8.5)

15mM EDTA

0.5% CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)

ゲノミック DNA 50 μ g/ml

NaCl 濃度を 0~1.5M の間で 0.05M 毎に調製した上記組成の溶液をそれぞれ作成し、沈殿ができる様子を調べた。その後、遠心して上清を捨て、沈殿物を再度水に溶解して、DNA の量を調べるため、260nm の吸光度を測定した。その結果を図 1 に示す。沈殿が始まる濃度を沈殿開始濃度とし、沈殿量が一定となる濃度をこの溶液の沈殿阻害開始濃度とした。この溶液の沈殿開始濃度は 0.7M であり、沈殿阻害開始濃度は 0.6M であった。

実施例 1

1) 300 マイクロリットル (エッペンドルフ試験管サイズのマイクロフィルター用) の全血に 750 マイクロリットルの下記組成を有する溶解溶液 A を加える。

溶解溶液 A :

尿素 25% (w/v),

CTAB (セチルトリメチルアンモニウムブロミド) 0.45%,

NaCl 0.8 M,

EDTA 15 mM,

Tris pH 7.1, 80 mM,

グリセロール 10% (v/v),

珪藻土 (シグマ試薬、酸洗浄の後に焼成したもの) 1% (w/v),

セルロース (シグマ社、アルファ・セルロース) 0.3%

グリセロールはシリカマトリックスの操作を容易にし、その目詰まりを防ぐという利点がある。

この溶液は DNA 結合性マトリックスを含んでおり、使用前にマグネチックスターラーで攪拌する。DNA 結合性マトリックスは、DNA 結合性マトリックスそのものの再懸濁を容易にしそれにより抽出の再現性を高める

ために不活性マトリックスと合わせて溶解してある。

溶解溶液を添加したのち、反転又は弱い攪拌により完全に混合する。溶解反応は室温又は穏やかな加熱下、すなわち 37°Cで行うことができる。インキュベーション時間は 5 分間とした。

2) 上記混合液を適当なフィルターに移し、減圧にかける。溶解反応液全体をフィルターに移すことで処理を単純化することができる。最終的に混入物質は洗い出され DNA が DNA 結合性マトリックス上に保持される。

3) 上記フィルターに 900 マイクロリットルの下記に組成を示す洗浄用溶液 A を加える。900 マイクロリットルの洗浄用溶液 A をフィルター漏斗に満たしそれによってフィルター全体を完全に洗浄するのに十分な容量である。減圧を加えて溶液を除去する。この工程によりフィルター中に存在する残存混入物を除去する。任意でこの工程を繰り返すことができる。これにより処理の再現性をあげることができる。

洗浄液 A :

尿素 25%,

CTAB 0.45%,

NaCl 0.55 M,

EDTA 15 mM,

Tris pH 7.1, 80 mM,

グリセロール 10% (v/v)

4) 液相が除去されたら、フィルターに 900 マイクロリットルの洗浄用溶液 B を加える。このアルコール性食塩水によりフィルター及び DNA 結合樹脂からカチオン洗剤を除去することができる。この溶液を加えた後、

減圧にかける前にイオン交換が完全になされるように数分間（2-4 分間）インキュベートすることが望ましい。任意でこの工程を繰り返し、処理の再現性を高めることもできる。洗浄液が除去されるまで減圧にかける。任意で、洗浄用溶液 B に混入している痕跡量の塩を全て除去するためにフィルターをさらに 70%エタノールで洗浄してもよい。

さらに 900 マイクロリットルの洗浄用溶液 B を加える。室温で 4 分間インキュベートする。再び減圧にかけて洗浄液を除去する。

洗浄液 B :

トライトン X 100, 0.069%,

Tris, 300 mM, pH 8.5,

EDTA, 7.5 mM,

NaCl 600 mM,

酢酸ナトリウム 600 mM,

グリセロール 30% (v/v)

（この溶液に使用前に 2 倍容量のエタノールを加えてエタノール最終濃度が 66%になるよう調整した。）

5) サンプルを含有しているフィルターを減圧にかけて通気して、エタノールが除去されるまで 3 ないし 5 分間乾燥させる。（この工程の代わりに遠心工程を行ってもよい）。

6) 50-100 マイクロリットルの（予め 60 又は 70℃に加熱した）水をフィルターに加える。このフィルターを遠心管に移す。DNA 結合マトリックスが細粒子になるまで(例えば、攪拌して)混合する（これが重要な工程となることがある）；室温で 2 分間インキュベートし、マイクロ遠心器で 30

秒間遠心する。単離され再懸濁された DNA はそのまま使用できる。

総時間：任意の工程を用いるかどうかによって、10 ないし 25 分間であった。

実施例 2

溶解溶液の NaCl 濃度を 0~1.8M の間で変えた以外は実施例 1 と同様に DNA を単離した。再懸濁された DNA 水溶液を電気泳動した結果を図 2 に示す。その結果、NaCl 濃度が 0.6~1.0M の範囲で DNA が良好に単離されていることが分かる。0~0.4M の範囲では、試料中のタンパク質が DNA に混在しており、精製が不十分であることが分かる。また、NaCl 濃度が 1.2M 以上の場合、DNA は回収できなかった。これは、DNA が担体に吸着しなかったためと考えられる。

本発明によれば、生体試料を前処理することなくそのまま使用することができ、かつ DNA の収率も高い精製された DNA を回収する方法を提供することができる。

特に本発明の方法は、オートメーション化が可能なように、必要により、遠心分離や抽出等の煩雑な操作も不要であり、より簡単な構造の器具を使用し、かつより少ない操作により行える方法である。

請求の範囲

(1) (a) DNAを含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有し、かつ前記塩の濃度がDNAの沈殿を阻害し始める濃度（以下、沈殿阻害開始濃度という）以上である溶解溶液を、DNA結合性担体と接触させて、前記試料中のDNAを前記DNA結合性担体に結合させる工程、

(b) DNAを結合した担体を他の成分から分離する工程、

(c) 分離した担体から結合したDNAを解離させる工程、及び

(d) 解離したDNAを回収する工程

を含む、生体試料中に含まれるDNAを単離する方法。

(2) 溶解溶液の塩濃度が、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下である請求項1に記載の方法。

(3) 生体試料が血液、細胞又は生体組織である請求項1または2に記載の方法。

(4) カチオン界面活性剤がセチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、及びセチルピリジニウムブロミドからなる群から選ばれる1種または2種以上の界面活性剤である請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

(5) 生体試料が少なくとも2本鎖直鎖DNA及び1本鎖直鎖DNAを含有し、かつ工程(a)において、2本鎖直鎖DNAをDNA結合性担体に選択的に結合させて、生体試料中に含まれる2本鎖直鎖DNAを選択的に単離する請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

(6) 溶解溶液としてさらに水素結合切断剤を含む溶液を用いる請求項5

に記載の方法。

(7) 水素結合切断剤が尿素またはホルムアルデヒドである請求項6に記載の方法。

(8) DNA結合性担体が、ガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト、セライト、セルロース、及び珪藻土からなる群から選ばれる材料からなる、メッシュフィルター、ビーズ、繊維または粉末である請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

(9) 少なくとも工程(a)を非加温下で行う請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

(10) 工程(b)において、DNAを結合した担体を濾過または遠心分離し、得られる担体を沈殿阻害開始濃度以上の塩濃度を有する洗浄溶液で洗浄することにより、DNAを結合した担体を他の成分から分離する請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

(11) 洗浄溶液が、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下の塩濃度を有する請求項10に記載の方法。

(12) 担体をカチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液及び揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液で順次洗浄する請求項10または11に記載の方法。

(13) 工程(c)において、分離した担体を、DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液と混合することにより、結合したDNAを担体から解離させる請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

(14) 洗浄溶液及び/又は溶解溶液がグリセロールを含有する請求項10～13のいずれか1項に記載の方法。

(15) 工程 (d) において、解離した DNA を含む溶液と担体との混合物を固液分離することにより、解離した DNA を溶液として回収する請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

(16) (A) 溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上に DNA 結合性担体を設けたカラムに、塩、カチオン界面活性剤及び DNA を含む生体試料を含み、かつ前記塩の濃度が沈殿阻害開始濃度以上である溶解溶液を供給して、前記生体試料中に含まれていた DNA を DNA 結合性担体に結合させる工程、

(B) 溶解溶液を吸引によりカラムから除去して DNA を結合した担体を他の成分から分離する工程、

(C) カラムに DNA 解離溶液を供給して、担体から DNA を解離させる工程、及び

(D) 解離溶液を吸引によりカラムから分離して解離した DNA を含む溶液を回収する工程

を含む、生体試料中に含まれる DNA を単離する方法。

(17) 溶解溶液の塩濃度が、沈殿阻害開始濃度の 2 倍の塩濃度または DNA の全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下である請求項 16 に記載の方法。

(18) 生体試料が血液、細胞又は生体組織である請求項 16 または 17 に記載の方法。

(19) カチオン界面活性剤がセチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、及びセチルピリジニウムブロミドからなる群から選ばれる 1 種または 2 種以上の界面活性剤である請求項 16 ~ 18 のいずれか 1

項に記載の方法。

(20) 生体試料が少なくとも 2 本鎖直鎖 DNA 及び 1 本鎖直鎖 DNA を含有し、かつ工程 (A) において、2 本鎖直鎖 DNA を DNA 結合性担体を選択的に結合させて、生体試料中に含まれる 2 本鎖直鎖 DNA を選択的に単離する請求項 16～19 のいずれか 1 項に記載の方法。

(21) 溶解溶液としてさらに水素結合切断剤を含む溶液を用いる請求項 20 に記載の方法。

(22) 水素結合切断剤が尿素またはホルムアルデヒドである請求項 21 に記載の方法。

(23) DNA 結合性担体が、ガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト、セライト、セルロース、及び珪藻土からなる群から選ばれる材料からなる、メッシュフィルター、ビーズ、繊維または粉末である請求項 16～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

(24) 少なくとも工程 (A) を非加温下で行う請求項 16～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

(25) 工程 (B) において、DNA を結合した担体を濾過し、得られる担体を沈殿阻害開始濃度以上の塩濃度を有する洗浄溶液で洗浄することにより、DNA を結合した担体を他の成分から分離する請求項 16～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

(26) 洗浄溶液が、沈殿阻害開始濃度の 2 倍の塩濃度または DNA の全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下の塩濃度を有する請求項 25 に記載の方法。

(27) 担体をカチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液及び揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液で順次洗浄する請求項

25または26に記載の方法。

(28) 工程(C)において用いる解離溶液が、DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液である、請求項16～27のいずれか1項に記載の方法。

(29) 洗浄溶液及び／又は溶解溶液がグリセロールを含有する請求項25～28のいずれか1項に記載の方法。

(30) 複数のDNAを含む試料からのDNAの単離を、基板に設けられた複数のカラムで並行して行う請求項16～29のいずれか1項に記載の方法。

☒ 1

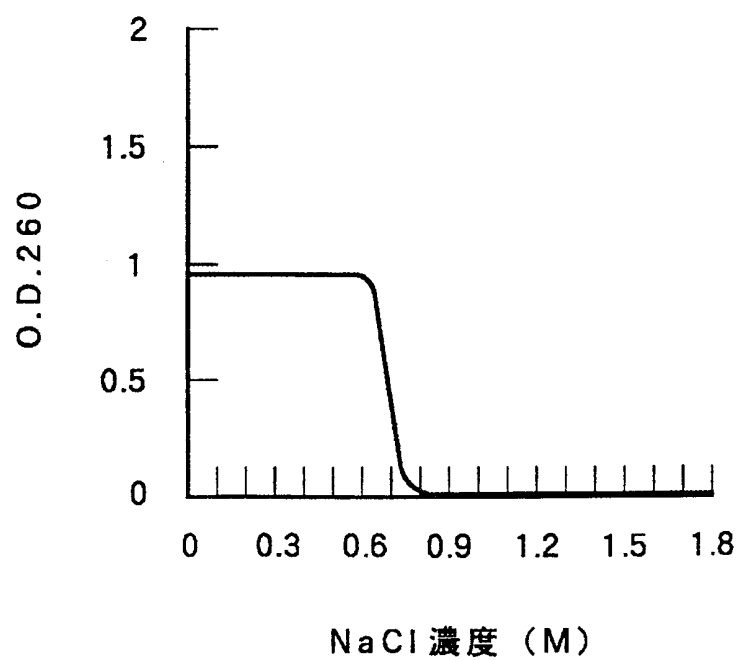
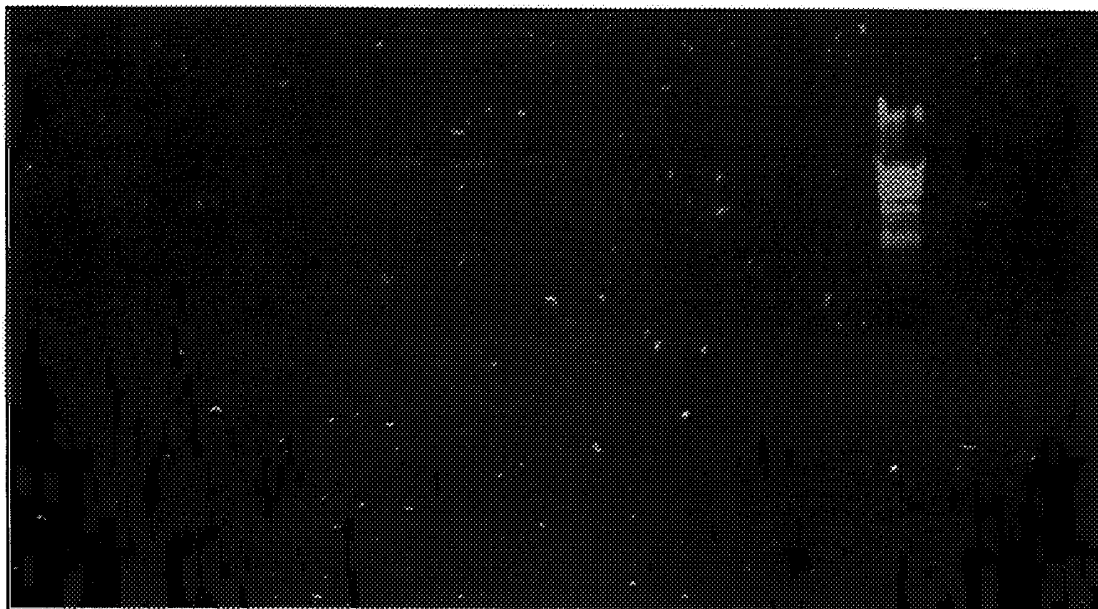


図 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



	NaCl濃度(M)
1	0
2	0.2
3	0.4
4	0.6
5	0.8
6	1.0
7	1.2
8	1.4
9	1.6
10	1.8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04201

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ C12N15/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ C12N15/10, C07H21/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST File (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-22762, A (Bekton Dickinson Co.), 1 February, 1994 (01. 02. 94) & EP, 555798, A & US, 5342931, A & AU, 9333035, A & CA, 2089119, A	1-30
A	JP, 4-360686, A (Tosoh Corp.), 14 December, 1992 (14. 12. 92) & EP, 517515, A	1-30
A	JP, 5-15373, A (Talent SRL), 26 January, 1993 (26. 01. 93) & EP, 442026, A & AU, 9170296, A & CA, 2019911, A & US, 5596092, A	1-30
A	JP, 2-289596, A (Akzo NV), 29 November, 1990 (29. 11. 90) & EP, 389063, A & NL, 8900725, A & AU, 9052153, A & CA, 2012777, A & ZA, 9002190, A & US, 5234809, A	1-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 7 October, 1998 (07. 10. 98)		Date of mailing of the international search report 20 October, 1998 (20. 10. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/04201

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Anal. Biochem., Vol. 103[2] (1980) Schneider W.C. et al., "Simplified Isolation and Quantitation of Cytoplasmic DNA from Rat Liver" p.413-418	1-30
A	Biokhimiya, Vol. 42[10] (1977) Naktinis V.J. et al., "Two simple methods for isolation of DNA from various sources using cetavlon" p.1783-1790	1-30
A	Anal. Chem., Vol. 64[22] (1992) Tong X. et al., "Solid-Phase Method for the Purification of DNA Sequencing Reactions" p.2672-2677	1-30

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))	
Int.Cl ⁶ C12N15/10	
B. 調査を行った分野	
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))	
Int.Cl ⁶ C12N15/10, C07H21/04	
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの	
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)	
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JOIS)	
C. 関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示
A	J P, 6-22762, A (Bekton Dickinson Co.) 1. 2月. 1994 (01. 02. 94) &EP, 555798, A &US, 5342931, A &AU, 9333035, A &CA, 2089119, A
A	J P, 4-360686, A (東ソー株式会社) 14. 12月. 1992 (14. 12. 92) &EP, 517515, A
A	J P, 5-15373, A (Talent SRL) 26. 1月. 1993 (26. 01. 93) &EP, 442026, A &AU, 9170296, A
	関連する 請求の範囲の番号
	1-30
	1-30
	1-30
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
07. 10. 98	20.10.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上 條 肇 電話番号 03-3581-1101 内線 3449
	4B 9453

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	&CA, 2019911, A &US, 5596092, A JP, 2-289596, A (Akzo NV) 29. 11月. 1990 (29. 11. 90) &EP, 389063, A &NL, 8900725, A &AU, 9052153, A &CA, 2012777, A &ZA, 9002190, A &US, 5234809, A	1-30
A	Anal. Biochem., Vol. 103[2] (1980) Schneider W. C. <i>et al.</i> 「Simplified Isolation and Quantitation of Cytoplasmic DNA from Rat Liver」 p. 413-418	1-30
A	Biokhimiya, Vol. 42[10] (1977) Naktinis V. J. <i>et al.</i> 「Two simple methods for isolation of DNA from various sources using cetavlon」 p. 1783-1790	1-30
A	Anal. Chem., Vol. 64[22] (1992) Tong X. <i>et al.</i> 「Solid-Phase Method for the Purification of DNA Sequencing Reactions」 p. 2672-2677	1-30